

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

Untersuchungen über optimale Verfahren
zum Nachweis
von Blut- und Serumgruppenmerkmalen
in Spermaflecken

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Hans-Hellmut Leonhardt

aus Darmstadt

Marburg 1968

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

**Untersuchungen über optimale Verfahren
zum Nachweis
von Blut- und Serumgruppenmerkmalen
in Spermaflecken**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Hans-Hellmut Leonhardt

aus Darmstadt

Marburg 1968

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 22. Februar 1968
Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert
Referent: Prof. Dr. med. F. Schleyer
Correferent: Priv. Doz. Dr. med. W. Schiff

Meinen lieben Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I n h a l t

	Seite
A. <u>Einleitung:</u> Bisher vorliegende Ergebnisse	
1. ABO-System	1
2. MN-System	3
3. Gm-System	3
B. <u>Eigene Versuche</u>	6
1. <u>Material</u>	6
2. <u>ABO-System</u>	6
I. Technik	6
a) Absättigungsversuch	6
b) Absättigungs-Absprengversuch	8
c) Mischagglutinationsversuch	11
II. Ergebnisse	12
3. <u>MN-System</u>	15
4. <u>Gm-System</u>	16
Ausführung und Ergebnisse ...	19
C. <u>Zusammenfassung</u>	23
D. <u>Literatur</u>	25

A. Einleitung: Bisher vorliegende Ergebnisse

1. ABO-System

Nach der Entdeckung der ABO-Blutgruppen im Jahre 1901 wurde 25 Jahre später die ABO-Eigenschaft auch in Körpersekreten, wie Speichel, Urin, Fruchtwasser und Sperma nachgewiesen. 80 % der Menschen scheiden ihre Blutgruppe sicher nachweisbar mit den Sekreten aus, die restlichen 20 % galten lange Zeit als "Nichtausscheider", da in ihren Sekreten keine Blutgruppensubstanz gefunden wurde. Doch USATSCHEV, KOSJAKOV und ROMNOVA fanden auch bei den bisher so genannten "Nichtausscheidern" eine geringe Menge Blutgruppensubstanz. BRONNIKOVA spricht daher von "schwachen" und "starken" Ausscheidern.

LANDSTEINER und LEVINE entdeckten 1926, daß Spermatozoen von Angehörigen der entsprechenden Blutgruppe durch Anti-A und Anti-B Serum nicht agglutiniert werden, obwohl sie diese Antikörper absorbieren. Diese Absorptionseigenschaft erwies sich als sehr stabil, denn sie wurde auch durch wiederholtes Waschen nicht vermindert. Der klassische Absorptionsversuch gestattet daher den Nachweis von A- und B-Substanz, aber bei der Blutgruppe O besteht die Frage, ob es sich wirklich um diese Eigenschaft, oder um einen schwachen Ausscheider handelt, dessen Absorptionsvermögen schlecht durch diese Versuchsanordnung zu erfassen ist. Hier empfiehlt es sich, mit Anti-H-Serum, einem

Phyttagglutinin, die Frage der Ausscheidung am Speichel der gleichen Person zu prüfen (BOYD und SHAPLEIGH). Dennoch raten viele Autoren (DAHR, BERG, RASCH, HELPERN und WIENER) den Absorptionsversuch zum Nachweis der ABO-Eigenschaft im Sperma an.

Eine andere, etwas einfachere Untersuchungsmethode, der Absorptions-Elutionsversuch nach KIND, wurde von einigen Forschern ebenfalls zum ABO-Nachweis im Sperma herangezogen. So prüfte UENO diese Methode an Spermaspuren. An der reinen Spermaspur bringt die Versuchsanordnung der Absättigungs-Absprengtechnik keinen Erfolg. UENO konnte aber Spermaflecken, die mit Blut verunreinigt waren, durch Anwendung der Absorptions-Elutionsmethode und des Absorptionsversuches nach Herkunft trennen. Der Absorptionsversuch gab Aufschluß über die Gruppeneigenschaft der Sekretspur, die Absättigungs-Absprengtechnik klärte die Blutgruppe der Blutspur, da dieser Versuch auf Sperma nicht ansprach.

PAPPALARDO berichtete über gelungene Versuche mit der Absorptions-Elutionsmethode an Spermaflecken. FIORI und BENCIOLINI haben dann festgestellt, daß das positive Ergebnis bei der Untersuchung von Spermaflecken mit dem Absättigungs-Absprengversuch vom Spermatozoengehalt des Fleckens abhängig ist. Die Ausscheidereigenschaft spielt hierbei keine Rolle. Für forensische Zwecke empfehlen sie die Absorptions-Elutionsmethode nur in Verbindung mit dem Absättigungsversuch.

Als dritte Methode wurde die Mischagglutination von COOMBS und DODD in die Blutspurendiagnostik eingeführt. SANGER und RACE forderten die Verwendung dieser Technik auch für die Spermauntersuchung. BENCIOLINI bezeichnet jedoch seine Ergebnisse mit der Mischagglutination an Spermaflecken als ungenau.

2. MN-System

Die Blutkörpercheneigenschaften M und N sind nicht, wie beim ABO-System, Isorezeptoren, sondern nur durch Immunsereen, die vom sensibilisierten Kanninchen stammen, im menschlichen Blute nachweisbar. Es ist bis jetzt unwahrscheinlich, daß die M und N-Eigenschaften außerhalb des Blutes vorkommen, denn in Körpersekreten wurden sie bisher nicht gefunden (DAHR, RASCH).

3. GM-System

Unter den erblichen Serumeigenschaften ist der Nachweis der Serumgruppe Gm von großer praktischer Bedeutung. Dieses System eignet sich gut zur weiteren "Individualisierung" von Blut in der Blutspurendiagnostik. Bei den Versuchen von GRUBB erwies sich die Gm-Substanz als sehr stabil gegenüber Alkali, Seife und Hitze bis $+63^{\circ}\text{C}$. Auch soll sie nach monatelangem Aufbewahren im Kühlschrank noch nachweisbar sein.

Um die Gm-Substanz auf Testblutkörperchen zu bringen, werden Rh-positive O-Blutkörperchen mit der Gm-Eigenschaft vom gesuchten Typ beladen. Dies geschieht, indem sie mit einem inkompletten Anti-D-Serum sensibilisiert werden, das von einer Person stammt, die Träger der betreffenden Eigenschaft ist. Die Gm-Substanz wird also auf die Testblutkörperchen gebracht und absorbiert somit homologes Anti-Gm-Serum. Wird zum Antiserum aber vorher Gm-haltige Substanz gegeben (z.B. Probandenserum oder Spurextrakt), so wird durch "Substratkonkurrenz" der Antikörper spezifisch gebunden, die Agglutination der sensibilisierten Test-Blutkörperchen durch das Anti-Gm-Serum wird gehemmt, tritt also nicht ein. Da mit der "Lösungsmethode" (Technik s.u.) die Gm-Eigenschaft zuverlässig in Blutflecken nachgewiesen werden kann (FÜNFHAUSEN, SAGAN, SCHRAMM, NIELSEN, HENNINGSEN und MÜNSCHER), wird schon seit einigen Jahren versucht, mindestens die Eigenschaft Gm (1) auch in den Sekreten nachzuweisen.

KRÄMER untersuchte das Gm (1) -Vorkommen in menschlichen Geweben und extravasalen Körperflüssigkeiten. Dabei fielen bei der Untersuchung von frischem Sperma einige schwach positive Gm (1) -Reaktionen auf. Die positive Reaktion war an die zelligen Elemente des Spermas gebunden und stimmte mit dem Serumbefund überein. Sperma von 40 Männern wurde von KLOSE und SCHRAVEN auf das Vorhandensein von Gm (1) untersucht. Sie fanden die Gm (1) -Sub-

stanz im frischem, bis 3 Tage altem Ejakulat. Ferner wurde bewiesen, daß die Stärke der Ausscheidung mit der des ABO-Systems gekoppelt ist. Neun schwache Ausscheider zeigten weder ABO noch Gm (1) im Sperma. Schließlich berichten NIELSEN und HENNINGSEN von einer Versuchsreihe an 23 Spermaproben. Es wurde ebenfalls frisches Sperma untersucht. Die Versuche verliefen jedoch ergebnislos, geringe Abweichungen wurden auf die unterschiedliche Viskosität des Ejakulates zurückgeführt.

B. Eigene Versuche

1. Material

Für die Untersuchungen wurden Spermaproben aus der Fertilitätssprechstunde der Universitäts-Hautklinik Marburg und Bonn verwendet ¹⁾. Etwa 6 cm² große, mit Samenflüssigkeit getränkte Leinenlappchen wurden im Brutschrank getrocknet. Außerdem ließen wir den Patienten Blut entnehmen, um eine Kontrolle für die Richtigkeit der Ergebnisse zu haben.

2. ABO-System

I. Technik

a) Absättigungsversuch

Prinzip: Der Spermafleck wird mit Anti-A- und Anti-B Serum in Röhrchen inkumbiert. Vor-und nachher wird der Serum-titer gegen Testblutkörperchen bestimmt. Eine Titerensenkung zeigt Gruppenzugehörigkeit des Fleckens an. Ausbleiben der Titererniedrigung läßt auf Blutgruppe O oder auf schwache, nicht meßbare Ausscheidung schließen.

1)

Für ihre freundliche Unterstützung bin ich Herrn Wiss. Rat Dr. U. S c h u l z e , Marburg und Herrn Prof. Dr. R. D o e p f m e r + , Bonn, zu großem Dank verpflichtet.

Ausführung: Der mit Sperma getränkte und anschließend getrocknete Stoff wird in etwa 5 mm² kleine Stückchen zerschnitten. Ein Zerzupfen ist nicht notwendig. Einige dieser Schnitzel werden in Teströhrchen gebracht (Durchmesser der Röhrchen etwa 7 mm), und zwar soviel Schnitzel, bis der abgerundete Boden des Röhrchens gerade ausgefüllt ist. Dazu kommen zwei Tropfen Antiserum. Anschließend werden die Röhrchen mit einem Gummistopfen fest verschlossen und für 24 Stunden in den Kühlschrank gestellt. Während dieser Zeit wird der Röhrcheninhalt wiederholt mit einem Glasstäbchen umgerührt. Für den Leerversuch wird mit spermafremem Stoff ebenso verfahren. Nach 24 Stunden werden die Ansätze zentrifugiert, und das überstehende Serum wird auf der Tüpfelplatte austitriert.

Herstellung der Verdünnungsreihe:

1. In jede Höhlung der Tüpfelplatte außer Nr. 1 ein Tropfen physiolog. Kochsalzlösung, so weit, wie voraussichtlich der Titer reichen wird.
2. In Höhlung Nr. 2 ein Tropfen unverdünntes Serum.
3. In Höhlung Nr. 1 ein Tropfen unverdünntes Serum.
4. Mischung in Höhlung Nr. 2 mit Pipette 1 - 2 mal hin- und herziehen.
5. Aus Höhlung Nr. 2 einen Tropfen in die nächste Höhlung übertragen, wieder mischen usw.
6. Aus der letzten Höhlung einen Tropfen verwerfen.

Nun in jede Höhlung einen Tropfen 5 %ige Blutkörperchen-aufschwemmung der heterologen Gruppe geben, durchrühren und in feuchte Kammer stellen oder gut mit einer Glasplatte zudecken. Nach 30 min. unter leichtem Hin- und Herbewegen ablesen.

Mit der gleichzeitig angesetzten Stoffprobe ohne Sperma wird ebenso verfahren. Außerdem muß natürlich auch das reine Testserum auf die gleiche Weise austitriert werden, um den eigentlichen Seramtiter zu bestimmen. Er dient als Basis für die Bewertung des Ergebnisses.

Ein Titerunterschied zwischen reinem Serum und mit Fleckenkonzentrat vorbehandeltem Serum muß mindestens zwei Stufen betragen.

b) Absättigungs-Absprengtechnik

(Absorptions-Elutionsmethode)

Prinzip: Der Antikörper wird zunächst an das homologe Antigen gebunden (Absorption), überschüssiger Antikörper danach ausgewaschen. Durch Erhöhen der Temperatur löst sich sodann der absorbierte Antikörper wieder (Absprengung, Elution). Zugegebene Testblutkörperchen werden im positiven Falle vom Eluat agglutiniert.

Ausführung:

1. Etwa 1 mm lange, mit Sperma getränkte und danach ge-

trocknete Fasern des Fleckens werden mit dem Skalpell in feinste Flöckchen zerzupft. Die Fasern entstehen am einfachsten, wenn die Stoffprobe wie beim obigen Versuch zerschnitten und die Schnitzel mit dem Skalpell aufgefaseret werden. Durch weiteres Zerzupfen der Fasern entstehen die Flöckchen.

2. Die Flöckchen werden in zwei Vertiefungen eines hydrophobierten ¹⁾ Hohlobjektträgers übertragen, und zwar soviel, wie ungefähr von einem Tropfen Serum benetzt werden kann.
3. Jetzt je einen Tropfen Anti-A und B-Serum auf das Spurenmaterial geben und mit einfachen oder Hohlobjektträgern zudecken.
4. Ansatz mindestens 2 Stunden in den Kühlschrank stellen.
5. Nach Ablauf der Einwirkungszeit Absaugen des Antiserums mit Mikropipette. Fasermaterial mindestens sechsmal mit eiskalter physiol. Kochsalzlösung sorgfältig waschen. Die Spülflüssigkeit muß nach der letzten Waschung klar sein. Die gereinigten Flöckchen sollen wieder ihre ursprüngliche Farbe zeigen. Das gilt natürlich besonders, wenn gefärbte Antiseren verwendet werden.
6. Zugabe von je 1 Tropfen 0,5 - 2 %iger ganz frischer (!) kalter Blutkörperchensuspension der Gruppe A zu Ansatz 2, der Gruppe B zu Ansatz 1. Die Aufschwemmung muß 1 % Albumin enthalten. (Herstellung: 5 ml 20 %iges

1)

Technik s. unten

Rinder-Albumin, physiol. NaCl-Lösung ad 100 ml).

7. Die Ansätze werden nun für 20 min. in eine feuchte Kammer gebracht. Diese muß eine Temperatur von 56°C haben. Damit eine gleichmäßige Temperatur gewährleistet ist, wird die leere Kammer 1 - 2 Stunden vorher in den Brutschrank gestellt.
8. Danach wird die Kammer noch bis zu vier Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. In der Regel kann aber schon früher das Ergebnis abgelesen werden. Keinesfalls dürfen die Proben eintrocknen.
9. Ablesen der Reaktion mit der Lupe, nachdem die Fasern mit einer Präparationsnadel aus der Flüssigkeit herausgezogen wurden (optimale Versuchstechnik nach den Angaben bei SCHLEYER für Blutspuren).

PAPPALARDO zerzupft den Stoff nicht, sondern bringt einen 5 X 2 mm großen Stoffetzen im Teströhrchen mit dem Antikörper zusammen. Zuvor wird die Sekretspur in kochendem Phosphatpuffer $\text{pH } 7,4$ nach COONS oder in kochendem Aqua dest. fixiert. Für 3 - 4 Stunden wird die Probe in den Kühlschrank gestellt, danach in kaltem Phosphatpuffer gewaschen und wie oben mit Testblutkörperchen angesetzt, die 3 % Rinderalbumin enthalten. Der weitere Verlauf von PAPPALARDOS Versuchsanordnung entspricht der oben angegebenen Absorptions-Elutionsmethode nach SCHLEYER.

Es sei an dieser Stelle schon gesagt, daß diese Methode keine Vorteile gegenüber der ersten bringt. Zwar

fällt das Zerzupfen und Zerfasern des Stoffes weg, dafür wird aber das Ergebnis ungenauer, da sich das Antiserum nicht so gründlich auswaschen läßt.

c) Mischagglutinationsversuch

Prinzip: Ein Antikörper bindet das ihm entsprechende Antigen. Wenn nach Waschen zur Entfernung des nichtgebundenen Antikörpers die ihm entsprechenden Testblutkörperchen hinzugefügt werden, so tritt eine Agglutination an der Stofffaser ein, wenn sie das homologe Antiserum enthält. Bei heterologem Antikörper kann keine Antikörperbindung eintreten, folglich unterbleibt die Agglutination. Die Stofffaser bleibt frei.

Ausführung:

1. Ein auf Stoff eingetrockneter Spermafleck wird für 15 min. zur Fixierung in Methanol gelegt, danach wieder vollständig getrocknet. Eine saubere Stoffprobe dient als Kontrolle.
2. Das Gewebe wird in feinste Flöckchen zerrissen, wobei darauf zu achten ist, daß als Substrat letztlich nur noch feinste Flöckchen vorliegen. Das Auffasern gelingt bei trockenen Spermaflecken im allgemeinen besser als bei den oft verkrusteten Blutspuren.
3. Das Fasermaterial auf je zwei hydrophobierte Röhrchen verteilen. Präparation der Röhrchen: mehrmals mit Chrom-

schwefelsäure waschen und anschließend in 1 %iger Siliconöl-Lösung in Chloroform legen. Die so benetzten Röhrchen werden bei 200° C für 4 - 6 Stunden im Brutschrank eingebrannt.

4. Je 2 - 3 Tropfen Anti-A- und Anti-B-Serum zugeben, leicht zentrifugieren und 12 Stunden in der Kälte stehenlassen.
5. Mehrmals mit kleinen Mengen physiol. NaCl-Lösung waschen.
6. Zu den gespülten Flöckchen 2-3 Tropfen 5 %ige Testblutkörperchen-Suspension geben. Unter Aufschütteln bis 15 min. stehenlassen.
7. Röhrchen leicht zentrifugieren, damit nichtgebundene Blutkörperchen sich absetzen.
8. Flöckchen instrumentell entfernen, möglichst ohne den Bodensatz aufzuwirbeln.
9. Spursubstrat auf Hohlobjektträger bringen und einige Tropfen physiol. NaCl-Lösung zugeben. Anschließend sofort mikroskopieren. Die Testblutkörperchen sollen bei positivem Ergebnis an der Stofffaser agglutiniert sein.

II. Ergebnisse

a) Absättigungsversuch

Diese Methode brachte die besten Ergebnisse. Fast immer konnte die A- oder B-Eigenschaft aus der Spermaspur be-

stimmt werden. Wie Tab. I und II zeigen, war die Titer-senkung bei Blutgruppe A in den meisten Fällen so stark, daß in keiner Verdünnungsstufe mehr eine Agglutination eintrat. Zugehörigkeit der Spur zu Blutgruppe B wies sich durch eine Titer-senkung von mindestens zwei Stufen gegen-über dem ursprünglichen Serومتiter aus. Blutgruppe O wurde angenommen, wenn sich bei der Titration mit Anti-A und Anti-B-Serum keine Titer-senkung zeigte. In diesen Fällen wurde anschließend eine Spurenprobe mit Anti-H-Phytagglutinin angesetzt, das Antiserum danach gegen O-Blutkörperchen aus-titriert. Fast alle in Frage kommenden Proben reagierten jetzt mit einer Titer-senkung, die sich in der Stärke wie bei den positiven Anti-A-Ansätzen verhielt. Die Unter-suchung des Blutes bestätigte dann das Vorliegen der Blut-gruppe O.

Für die forensische Praxis bedeutet das, daß auch weiterhin nur die Gruppen A und B allein aus der Spur nach-gewiesen werden können. Mit dem Anti-H-Serum wird festge-stellt, ob überhaupt eine Blutgruppe ausgeschieden wird. Denn BOYD und SHAPLEIGH fanden, daß die Agglutination im Speichel sogenannter "Nichtausscheider" nicht so stark ge-hemmt wird wie beim "Ausscheider". Dies konnte bei der Spermaspur bestätigt werden (Nr. 12 und 16).

Inwieweit die nichtnachweisbare Ausscheidung von Blutgruppensubstanz von dem spermatologischen Befund ab-hängt, ließ sich nicht klären, da unsere Versuche in diesem Punkt widersprechende Ergebnisse brachten. Denn bei dem

Tabelle II. Absorptionsversuche 14-24.

Diese Versuchsreihe konnte zügig ablaufen. Der Leerversuch war nicht bei jedem Versuch erforderlich. Die spermatologischen Befunde wurden uns hierbei freundlicherweise mitgeteilt. Sie sind mitangeführt. Der Leinenstoff konnte bei der gesamten Versuchsreihe unberücksichtigt bleiben, da er nicht absorbierte.

Lfd. Nr.	Antiserum	Titer											Diagnose aus:	
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256			Blut	Spermallecken
14	Anti-A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A
	B	+++	+++	++	++	+	(+)	-	-	-	-	-		
	H	-	-	entfällt		-	-	-	-	-	-	-		
15	Anti-A	+++	+++	++	++	++	+	(+)	-	-	-	-	O	O (Normospermie)
	B	+++	+++	++	++	++	+	(+)	-	-	-	-		
	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
16	Anti-A	+++	+++	+++	++	+	+	(+)	-	-	-	-	O	Ø "Nichtaussch." (Schwere Oligospermie)
	B	+++	++	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-		
	H	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
17	Anti-A	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	A	A (oligo-teratospermie)
	B	+++	+++	++	++	+	(+)	-	-	-	-	-		
	H	-	-	entfällt		-	-	-	-	-	-	-		
18	Anti-A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A (Aspermie)
	B	++	++	++	++	+	(+)	-	-	-	-	-		
	H	-	-	entfällt		-	-	-	-	-	-	-		
19	Anti-A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A (Oligospermie)
	B	+++	+++	++	++	+	+	(+)	-	-	-	-		
	H	-	-	entfällt		-	-	-	-	-	-	-		
20	Anti-A	+++	+++	++	++	+	+	(+)	-	-	-	-	B	B (Normospermie)
	B	++	++	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-		
	H	-	-	entfällt		-	-	-	-	-	-	-		
21	Anti-A	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A (oligo-asthenospermie)
	B	+++	++	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-		
	H	-	-	entfällt		-	-	-	-	-	-	-		
22	Anti-A	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A (Hypospermie)
	B	+++	++	++	+	+	+	(+)	-	-	-	-		
	H	-	-	entfällt		-	-	-	-	-	-	-		
23	Anti-A	+++	+++	++	++	++	+	(+)	-	-	-	-	A	Ø "Nichtaussch." (Normospermie)
	B	+++	+++	++	++	++	+	(+)	-	-	-	-		
	H	++	++	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-		
24	Anti-A	+++	+++	++	++	++	+	+	(+)	-	-	-	O	O (Athesiospermie)
	B	+++	++	++	+	+	+	(+)	-	-	-	-		
	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

Versuch Nr. 16 und 17 könnte das Fehlen der Ausscheidung oder die geringe Titer senkung mit dem spermatologischen Befund zusammenhängen. Bei beiden Ejakulaten lag eine Oligospermie vor. Dem widerspricht allerdings der Befund bei Nr. 18 und 21. Hier lag ebenfalls ein pathologisches Sperma vor, jedoch lieferte hier unser Versuch ein brauchbares Ergebnis.

b) Absättigungs-Absprengversuch

Diese Methode haben wir vorher an Blutflecken erprobt. Nachdem anfängliche technische Unzulänglichkeiten beseitigt waren, bekamen wir recht zuverlässige Ergebnisse.

Beim Spermafleck versagte dieser Versuch in fast allen Fällen (Tab. III). Schwach positive Ergebnisse bei den ersten Versuchen stellten sich bald als falsch heraus. Der Fehler, bedingt durch ungenügendes Auswaschen des zugegebenen Antiserums, wurde beim Kontrollversuch durch sehr sorgfältiges Auswaschen der Flöckchen beseitigt.

Zwei Spermaproben (Nr. 12 und 23), die beim oben beschriebenen Absättigungsversuch keine Titer senkung ("Nicht-ausscheider") zeigten, erbrachten bei der Absorptions-Elutionsmethode deutliche Agglutination, also ein positives Ergebnis. Trotz mehrfacher Wiederholung des Versuches, auch mit anderen Antiseren und Testblutkörperchen, blieb es bei dem positiven Resultat. Das von PAPPALARDO angegebene Verfahren zeigte hierbei ebenfalls positive Reaktion. Vielleicht handelt es sich bei diesen Proben um besonders visköses, zellreiches

Sperma, das nach BENCIOLINI und FIORI im Absorptions-Elutionsversuch positive Ergebnisse zeigen soll. Eine Verunreinigung mit Testblutkörperchen oder anderem Blut lag bei unseren Proben sicherlich nicht vor. Leider zeigte sich das Phänomen nur bei zwei Fällen, so daß es nicht weiter zu klären war. Auch war es nicht möglich, die Konsistenz des Spermas zu bestimmen, da ja alle Flecken schon trocken oder mindestens angetrocknet zur Untersuchung kamen.

Es muß also mit BENCIOLINI und FIORI gefolgert werden, daß bei Blutgruppenbestimmungen aus Spermaflecken der Absättigungs-Absprengversuch als Zweitversuch ^{nur} angewandt werden sollte.

c) Mischagglutinationsversuch

Diese Bestimmungsmethode versagte in allen Fällen.

Zweifelhafte Ergebnisse waren nicht zu sehen. Die Resultate wurden, wie oben beschrieben, mikroskopisch abgelesen. Immer zeigte sich die nackte Stofffaser. Die Testblutkörperchen schwammen frei in der Kochsalzlösung.

3. MN-System

Die Bestimmung der Blutfaktoren M und N wurde mit den obengenannten Methoden versucht. Alle Ansätze hatten ein negatives Ergebnis. Die Angaben von DAHR und anderen konnten somit bestätigt werden.

Tabelle III. Ergebnisse der Absorptions-Elutionsmethode.
 Mitangeführt sind die Resultate der Blutgruppenbestimmungen
 aus den Probandensereren sowie die Ergebnisse des Absorptions-
 versuches.

Lfd. Nr.	Absorptions-Elutionsversuch Anti-A-Serum	Anti-B-Serum	Diagn. aus Blut	Absorptionsversuch
1	Ø	Ø	A	A
2	Ø	Ø	O	O
3	Ø	Ø	O	O
4	Ø	Ø	A	A
5	Ø	Ø	O	O
6	Ø	Ø	B	B
7	Ø	Ø	B	B
8	Ø	Ø	A	A
9	Ø	Ø	O	O
10	Ø	Ø	O	O
11	Ø	Ø	A	A
12	+	Ø	A	Ø
13	Ø	Ø	O	O
14	Ø	Ø	A	A
15	Ø	Ø	O	O
16	Ø	Ø	O	Ø
17	Ø	Ø	A	A
18	Ø	Ø	A	A
19	Ø	Ø	A	A
20	Ø	Ø	B	B
21	Ø	Ø	A	A
22	Ø	Ø	A	A
23	+	Ø	A	Ø
24	Ø	Ø	O	O

4. Gm-System

Vorversuche: Zuerst wurde der Gm-Nachweis an Blutflecken erprobt. Wir bedienen uns hier der bei SCHLEYER beschriebenen Absorptionsmethode. Genau wie beim ABO-Nachweis wird das Untersuchungsmaterial (in diesem Falle die mit Blut benetzten Stoffschnitzel) in Röhrchen für etwa 12 bis 15 Stunden mit unverdünntem Gm-Serum bedeckt.

In der Zwischenzeit werden die Testblutkörperchen nach folgender Vorschrift beladen:

1. Rh-positive Erythrozyten der Blutgruppe 0 werden dreimal mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen.
2. 0,1 ml des Sediments werden mit 0,9 ml des mit physiol. NaCl-Lösung 1:10 verdünnten Anti-D-Serum eines homologen Gm-Trägers gemischt und für 60 min. bei 37° C in den Brutschrank gestellt.
3. Das Sediment wird danach viermal mit der etwa 50fachen Menge physiol. Kochsalzlösung gewaschen.
4. Anschließend wird das Sediment in 2 ml physiol. NaCl-lösung suspendiert (etwa 5 %ige Suspension).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Spursubstrat ebenfalls 1:10 verdünnt und auf einem "Rackwitz-" oder "Lauerplättchen" (Objektträger mit Stegen) mit einer gleichen Menge Anti-Gm-Serum aufgetragen und mit Glasstab gut vermischt. Es ist darauf zu achten, daß die Tropfenmenge ungefähr gleich groß ist. Nach 5-10 min. wird ein entsprechend großes Tröpfchen der sensibilisierten Erythrozytensuspension

zugefügt und gut vermischt. Die Objektträger mit den Reaktionsansätzen einschließlich einer "negativen" und "positiven" Kontrolle (1 Tropfen verdünntes Probandenserum, 1 Tropfen physiol. NaCl-Lösung, 1 Tropfen sensibilisierte Erythrozytensuspension; 1 Tropfen Anti-Gm-Serum, 1 Tropfen physiol. NaCl-Lösung, 1 Tropfen sensibilisierte Erythrozytensuspension) werden in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert. Ferner sind bekannte Serumproben, die den Gm-Faktor enthalten, Flecken auf Stoff und mit Gm-Serum getränkter Stoff mitzuführen.

Nach einer Stunde ist das Ergebnis unter vorsichtigem Hin- und Herkippen des Objektträgers abzulesen. Fehlt die Agglutination, dann enthält die Blutspur Gm, tritt die Agglutination ein, fehlt der Gm-Faktor.

Auf diese Weise wurden von uns Blutflecken, teils im Blindversuch, untersucht. Die Methode erwies sich als absolut sicher. Die Versuche, sowohl am Blut, als auch an Spermaflecken wurden auf den Nachweis von Gm (1) beschränkt. Zur Zeit stehen im Handel neben Anti-Gm (1)-Serum nur Anti-Gm (2)- und allenfalls Anti-Gm (3)-Serum zur Verfügung. Der Versuchsablauf wäre für jede Gm-Eigenschaft die gleiche.

Beim Gm-Nachweis im Spermafleck wurde zuerst davon ausgegangen, daß Gm-Substanz analog dem ABO-System ausgedehnt wird (KRÄMER, KLOSE und SCHRAVEN). Zuerst wurden einige Blutproben von Patienten auf Gm (1) untersucht. Danach wurde bei den dazugehörenden Spermaflecken die oben beschriebene Methode angewandt. Obwohl sich Gm (1) bei der

Blutuntersuchung nachweisen ließ, fand sich die Gm-Eigenschaft in den Flecken nicht wieder.

Bei einer zweiten Versuchsreihe wurde das Antiserum 1:20 mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt. Auch jetzt zeigte sich keine Agglutinationshemmung.

Ein weiterer Schritt ging von der Annahme aus, daß die Gm-Substanz nicht so hochkonzentriert ausgeschieden wird, daß sie mit den bisher verwendeten Verdünnungsstufen erfaßt worden wäre. Kurzerhand wurde deshalb, wie beim Absorptionsversuch des ABO-Systems, mit dem Spursubstrat eine Verdünnungsreihe hergestellt, die auf einer Tüpfelplatte gegen sensibilisierte O/D-Blutkörperchen aufgetragen wurde. Dabei fand sich gegenüber der negativen Kontrolle, der Stoffprobe und dem Gm-negativen Spursubstrat bei einer Verdünnung von 1:32 ein Unterschied von einer Stufe. Bei dem zu prüfenden Spursubstrat war die Agglutination bei dieser Verdünnungsstufe gehemmt, bei den anderen Proben nicht.

Der gleiche Versuch wurde nochmals wiederholt, aber diesmal auf "Lauerplättchen". Um die Fehlermöglichkeit der verschiedenen großen Tropfen zu vermeiden, wurden die Tropfen mit der Mikropipette auf 0,02 ml abgemessen. Wieder zeigte sich die Agglutinationshemmung, nur noch viel deutlicher. Auch wurde ein Spursubstrat mitgeführt, dessen Gm (1) -Gehalt nicht bekannt war, wohl aber die Ausscheidereigenschaft im ABO-System (Nr.9, Blutgruppe A). Es trat eine Agglutinationshemmung ein, die Blutuntersuchung bestätigte das Vorliegen der Serumgruppe Gm (1).

Ausführung und Ergebnisse

Vorversuch (vgl. Abb. 1):

1. Ein etwa 3 cm² großes Stück eines 10 Tage alten Spermafleckens, der von einem Gm (1) -positiven ABO-Ausscheider stammte und getrocknet im Kühlschrank aufbewahrt wurde, wurde fein zerschnitten (Zerfasern unnötig), in ein Röhrchen gebracht und mit einem Tropfen Gm (1) -Serum versehen. Das mit einem Gummistopfen verschlossene Röhrchen wurde für 24 Stunden in den Kühlschrank gestellt. (Die zu untersuchende Stoffprobe entsprach bei unseren Versuchen etwa einem Sektor aus dem Spermafleck).
2. Während dieser Zeit wurden O/D (=Rh-positive) Blutkörperchen nach der oben beschriebenen Technik beladen.
3. Die angesetzte Probe wurde nach Ablauf von 24 Stunden, wie bei der Absättigungsmethode, auf der Tüpfelplatte oder einem Objektträger mit Stegen austitriert. Die beladenen Erythrozyten dienten als Testblutkörperchen. Tropfen mit Mikropipette 0,02 ml abmessen.
4. Zum Vergleich wurde mit reinem Anti-Gm (1) -Serum und denselben Testblutkörperchen ebenso verfahren (negative Kontrolle).

Es soll sich ein Unterschied von einer Verdünnungsstufe darstellen. Das Gm (1) -positive Spursubstrat hemmt eher. (Bei unseren Versuchen lag diese "kritische Verdünnungsstufe" bei 1:32)

5. Ablesen mit der Lupe auf einem Leuchtkasten, sofern transparente Objektträger mit Stegen verwendet werden. "Kritische Verdünnungsstufe" notieren und diese fortan für Hauptversuch verwenden. Titrieren ist dann überflüssig. In der Praxis wäre der Vorversuch auch noch an einem Trockenblutfleck bekannten Gm-Typs vorzunehmen.

Hauptversuch (vgl. Abb. 2):

Das zu untersuchende Spermafleckenmaterial kann mit der vorher bestimmten Anti-Gm-Verdünnung inkubiert werden. Die Tropfen müssen jedoch mit der Mikropipette genau abgemessen werden.

1. Kleingeschnittenen Fleckenstoff im Röhrchen mit dem verdünnten Anti-Gm-Serum, dessen Titer im Vorversuch bestimmt wurde, zusammenbringen.
2. Ansatz für 24 Stunden in den Kühlschrank stellen, häufig mit Glasstäbchen umrühren.
3. Nach Aufschütteln Entnahme von 0,02 ml mit Mikropipette.
4. Auftragen der abgemessenen Menge auf ein "Lauer-" oder "Rackwitzplättchen" (Objektträger mit Stegen). Die Menge der Reaktionspartner muß genau übereinstimmen, da eine geringfügige Veränderung der Verhältnisse schon ein falsches Ergebnis bringen kann.
5. Auftragen der gleichen Menge (0,02 ml) mit Mikropipette, mischen mit Glasstab.

Abbildung 1. Schema der Bestimmung der Gm-Eigenschaft in Spermaflecken (Vorversuch)

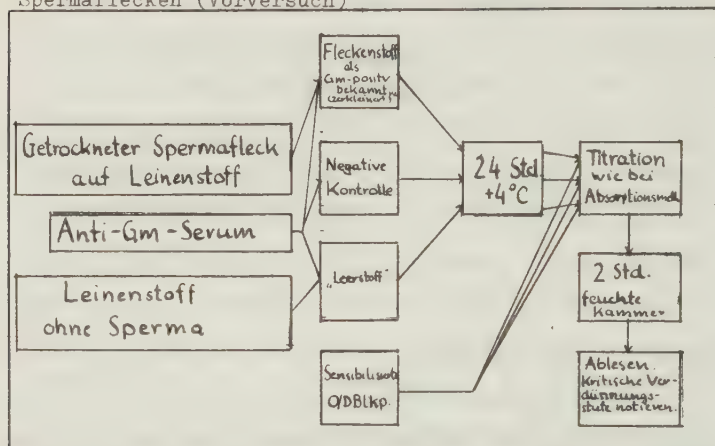
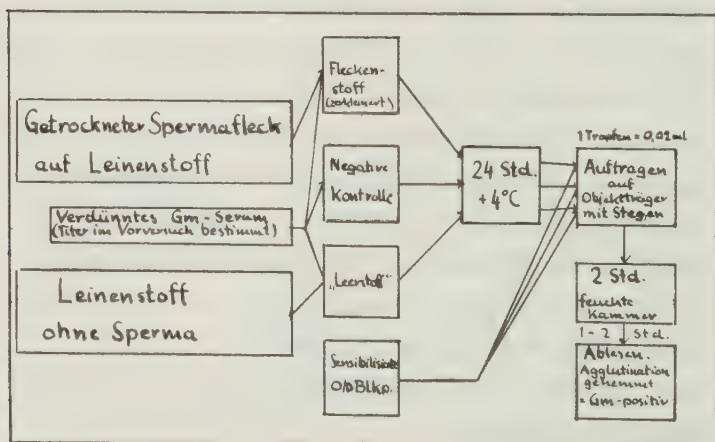


Abbildung 2. Schema der Bestimmung der Gm-Eigenschaft in Spermaflecken (Hauptversuch)



6. Ansatz für eine Stunde in feuchte Kammer.
7. Kontrollversuch mit Leerstoff, reinem Gm-Serum, Patientenserum Gm-positiv und negativ, sowie mit physiol. NaCl-Lösung.
8. Ablesen nach 60 bis 120 min.

Ergebnis: Agglutination bedeutet Gm-negativ, ihr Ausbleiben ein Vorhandensein des Gm-Faktors.

Bei unseren Spermaproben war das Ergebnis nicht immer eindeutig, manchmal war die Hemmung nicht vollständig. Es mußte der Vergleich der Ergebnisse entscheiden: Es wurde das Resultat des Spermasubstrates mit dem des Leerstoffs und dem negativen Kontrollansatz verglichen. Immer absorbierte der Stoff etwas, aber es bestand ein deutlicher Unterschied zum Spermaansatz. Dadurch, daß die mitgelieferten Blut- bzw. Serumproben ebenfalls auf den Serumfaktor Gm (1) untersucht wurden, war jederzeit eine Kontrolle der Methode möglich (Tab. IV). Bei allen starken ABO-Ausscheidern, die Gm (1) -positiv waren, fand sich diese Eigenschaft im Sperma wieder. Inwieweit Oligo- und Aspermie den Gm (1) -Nachweis beeinflussen, ließ sich nicht beurteilen, ebenso muß es weiteren Forschungen vorbehalten bleiben, in welcher Fraktion des Ejakulates (in der zelligen oder flüssigen) die Gm-Substanz ausgeschieden wird.

Die Erfolgsaussichten in der forensischen Praxis sind wegen der Verteilung der Gm-Merkmale relativ ungünstig. Denn 20 % fallen als schwache Ausscheider für den Gm-Nach-

weis im Spermafleck sowieso aus, 50 % der Menschen sind Gm (1) -negativ.

Dennoch kann eine Sekretspur durch den Nachweis von Gm (1) näher "individualisiert" werden.

C. Zusammenfassung

Aufgabe der Arbeit war, aus eingetrockneten Spermaflecken Blut- und Serumgruppen zu bestimmen. Es wurden 24 Spermaflecken aus der Fertilitätssprechstunde der Universitäts-Hautklinik Marburg und Bonn auf das Vorhandensein von ABO-, MN-, Gm (1) -Substanz untersucht. Von allen Probanden wurden gleichzeitig die fraglichen Blut- und Serumeigenschaften an einer frischen Blutprobe bestimmt.

Beim ABO-Nachweis wurden nebeneinander der Absorptionsversuch, die Absorptions-Elutionsmethode und der Mischagglutinationsversuch angewandt. Nur der Absorptionsversuch lieferte exakte Ergebnisse: Die Blutgruppen A und B ließen sich sicher mit dieser Methode nachweisen. Auf Vorliegen der Blutgruppe O im Spermafleck konnte geschlossen werden, wenn bei negativer Hemmreaktion gegenüber Anti-A- und Anti-B-Serum ein Hemmversuch mit Anti-H-Serum ein positives Ergebnis zeigte.

Die Versuche mit der Absorptions-Elutionsmethode verliefen bis auf eine Ausnahme ergebnislos. Da aber bei viskösem, zellreichem Sperma der Absorptions-Absprengversuch der Literatur zufolge positiv sein soll, sollte diese Methode dennoch mitherangezogen werden.

Der Mischagglutinationsversuch verlief bei allen Proben negativ.

Der Nachweis der Blutgruppen M und N wurde mit den obengenannten Proben versucht. Er gelang niemals; dies stimmte

Tabelle IV. Ergebnisse des Gm (1)-Nachweises in Spermaflecken.
 Zum Vergleich sind die Resultate der Serumuntersuchung und
 der ABO-Absorptionsmethode mitangeführt.

Lfd. Nr.	Gm (1) im Spermafleck	Gm (1) im Serum	ABO-Eigenschaft nachgewiesen	Stofffaser
1	+	+	+	(±)
2	-	-	+	(±)
3	-	-	+	(±)
4	-	-	+	(±)
5	-	-	+	(±)
6	-	-	+	(±)
7	+	+	+	(±)
8	-	-	+	(±)
9	+	+	+	(±)
10	-	-	+	(±)
11	-	-	+	(±)
12	-	-	-	(±)
13	-	-	+	(±)
14	-	-	+	(±)
15	(±)	+	+	(±)
16	+	+	-	(±)
17	-	-	+	(±)
18	-	-	+	(±)
19	-	-	+	(±)
20	+	+	+	(±)
21	-	+	+	(±)
22	+	+	+	(±)
23	-	+	-	(±)
24	-	-	+	(±)

mit den Literaturergebnissen überein, die bisher nur mit der Hilfe des klassischen Absättigungsversuches gewonnen waren.

Die Serumgruppe Gm (1) wurde im Spermaflecken gefunden. Zum Nachweis diente eine ähnliche Technik wie beim Gm (1) -Nachweis in Blutspuren, nur wurden hier das Spursubstrat und das Testserum bis zu einem bestimmten Titer verdünnt, außerdem wurde die Tropfenmenge genau abgemessen. Der erforderliche Titer wurde durch einen Vorversuch, der dem Absorptionsversuch ähnlich ist, bestimmt.

D. Literatur

- BENCIOLINI, P.: La agglutinatione mista.
Med. Leg.Ass. 12, 1964
- BERG, S.: Das Sexualverbrechen.
Hamburg (Kriminalistik) 1963
- BOYD, W. and
SHAPLEIGH, F.: Blood 9, 1195, 1954,
zit. nach TOBISKA, J.: Die
Phyttagglutinine, Hämatologie und
Bluttransfusionswesen.
Band 3, Akademie Verlag Berlin
1964
- BRONNIKOVA, M.A.: The Significance of Typing the
Human Secretions in Mediollegal
Practice.
Sud.med.Expert. 4, 29, 1961;
ref. Z. gerichtl.Med. 55, 262,
1964
- COOMBS, R. and DODD, B.: Possible Application of Mixed
Agglutination in the Identi-
fication of the Blood Stains.
Med., Sci. Law, 1, 359, 1961
- DAHR, P.: Die Technik der Blutgruppen- und
Blutfaktorenbestimmung.
Thieme (Leipzig) 1944
- FIORI, A. and
BENCIOLINI, P.: The Question of Grouping the
Secretions Stains.
Abstract IIIrd Congr. Polish For.
Med., Breslau 16.-19. Sept. 1965

- FÜNFHAUSEN, G., SAGAN, Z.,
und SCHRAMM, K.: Über den Nachweis von Gm_a in
Blutspuren.
Z. gerichtl. Med. 53, 18, 1962
- HELPERN, M. and
WIENER, A.: Grouping of Semen in Cases of
Rape.
Fertility, 6, 12, 1961
- KIND, S. : Absorption-Elution Grouping of
Dried Blood Smears.
Nature 185, 397, 1960
- KLOSE, I. und
SCHRAVEN, J.: Die Bestimmung von Gm_a im Sperma.
Z. gerichtl. Med. 52, 610, 1961/62
- KRÄMER, K.: Untersuchungen über das Vorkommen
von Gm_a -Substanz in menschlichen
Geweben und extravasalen Körper-
flüssigkeiten.
Z. gerichtl. Med. 53, 137, 1962/63
- LANDSTEINER, K. and
LEVINE, P.: Zit. nach SANGER, R. and RACE, R.:
Blutgruppen des Menschen.
35, Thieme (Stuttgart) 1958
- MÜNSCHER, F.: Blindversuche zur ABO-, MN-, Gm_a -
und Hp-Bestimmung an Blutflecken.
Diss. Marburg (im Druck)
- NIELSEN, J. and
HENNINGSEN, K.: Experimental Studies on the
Determination of the Gm-Groups
in Blood-Stains.
Med., Sc. and Law, 3, 49, 1963

- NIELSEN, J. and
HENNINGSEN, K.:
Note on the Possibility of
Demonstrating the Gm-Factors in
Semen.
Med., Sci. and Law 272, 1963
- PAPPALARDO, G.:
La ricerca delle proprietà gruppo
specifiche AB in macchie di sperma
col methodo dell' assorbimento-
eluzione.
Min. medioleg. 84, 19, 1964
- PROKOP, O. und
UHLENBRUCK, G.:
Lehrbuch der menschlichen Blut-
und Serumgruppen.
Leipzig 1963
- RASCH, I.:
Lehrbuch der Blutgruppenkunde,
232, Walther de Gruyter-Verlag
Berlin 1954
- SCHLEYER, F.:
Leitfaden der gerichtlich-medi-
zinischen Blutspurenuntersuchung.
Schmidt-Römhild Lübeck 1966
- UENO, S.:
An Improved Technique for Deter-
mination of a Group of Blood,
Saliva and Semen Staining.
Z. Immunforsch. 125, 230, 1963
- USATSCHEV, KOSJAKOV
und ROMNOVA;
zit. nach BRONNIKOVA, M.A.:
The Significance of Typing the
Human Secretions in Mediolegal
Practice.
Sud. med. Expert 4, 29, 1961;
ref. Z. gerichtl. Med. 55,
262, 1964

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten

in Gießen: Ankel, v. Denffer, Hanle,
Kröhnke, Rollhäuser,
Schuchhardt, Staudinger,
Thauer.

in Mainz: Brandt, Bredt, Borneff,
Dabelow, Duesberg, Lang,
Oppel, Haas, Schriever,
Watzka.

in Wien: Brücke, Fuchsig, Gitsch,
Hoff, Jesserer, Lindner,
O. Novotny, Tappeiner.

in Marburg: Braun-Falco, Bommer, Buch-
holz, Dölle, Exner, Gedigk,
Hamm, Heuser, Hildebrandt,
Jacob, Linneweh, Mann,
Martini, du Mesnil de Roche-
mont, Schleyer, W. Schmid,
Siegert, Straub, Streicher,
Würterle.

Lebenslauf

Am 5.9.1939 wurde ich, Hans-Hellmut Walter Leonhardt als Sohn des Dipl.-Chemikers und Apothekers Dr. Hans Leonhardt und seiner Ehefrau Gertraud geb. Estler in Darmstadt geboren. Nach vier Grundschuljahren von 1946 bis 1950 in der Bessunger Knabenschule Darmstadt, besuchte ich das altsprachliche Ludwig-Georgs Gymnasium in Darmstadt, wo ich im Februar 1960 die Reifeprüfung ablegte. Zum Sommersemester 1960 begann ich das Medizinstudium in Gießen und bestand dort im Frühjahr 1961 das Vorphysikum. Zur Fortsetzung des Studiums ging ich im Frühjahr 1962 nach Mainz, wo ich Ostern 1963 das Physikum ablegte. Nachdem ich im Wintersemester 1963/64 in Wien studiert hatte, kam ich zum Sommersemester 1964 nach Marburg. Dort bestand ich im Oktober 1966 das medizinische Staatsexamen.

Meine Medizinalassistentenzeit begann ich im November 1966 an der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg. Im Juni 1967 ging ich für vier Monate an die Chirurgische Klinik der Städt. Krankenanstalten Dortmund. Seit November 1967 arbeite ich an der Frauenklinik der Städt. Krankenanstalten Darmstadt.

